

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMAKOGNOZIE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vliv elicítace na produkci suspenzní kultury

Trifolium pratense L.

Adéla Keřková

Vedoucí katedry: Doc. RNDr. Jaroslav Dušek, CSc.

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Marie Kašparová, Ph.D.

Oponent:

Úvodem své diplomové práce bych chtěla poděkovat vedoucí diplomové práce PharmDr. Marii Kašparové, Ph.D. za odborné vedení při jejím zpracování. Zároveň děkuji za cenné rady a připomínky.

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

Obsah

1. ÚVOD.....	5
2. CÍL PRÁCE.....	6
3. TEORETICKÁ ČÁST	7
3.1. <i>Trifolium pratense</i> L. - jetel luční, <i>Fabaceae</i> (bobovité)	7
3.1.1. Botanický popis rostliny	7
3.1.2. Výskyt	8
3.1.3. Odrůdy	11
3.1.4. Sběr a úprava drogy	13
3.1.5. Použití	13
3.1.6. Obsahové látky.....	13
3.2. Rostlinné kultury <i>in vitro</i>	26
3.2.1. Obecná charakteristika	26
3.2.2. Vlastnosti kultur rostlinných explantátů	28
3.2.3. Etapy kultivace explantátových kultur.....	30
3.2.4. Podmínky kultivace rostlinných explantátů	31
3.2.5. Produkce sekundárních metabolitů	35
3.2.6. Biotechnologické využití rostlinných explantátových kultur	36
3.2.7. Fáze růstu kultury.....	36
3.3. Elicitace	38
3.3.1. Charakteristika elicítace	38
3.3.2. Mechanismus účinku elicitoru	40
3.3.3. Elicitory	42
3.3.4. Kadmium.....	43
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	44
4.1. Použitý materiál, přístroje a pomůcky	44
4.1.1. Rostlinný materiál	45
4.1.2. Stanovení ztráty sušením	45
4.1.3. Chemikálie	45
4.1.4. Přístroje a pomůcky.....	46
4.2. Kultivace explantátové kultury	47
4.2.1. Kultivační nádoby a nástroje.....	47
4.2.2. Příprava živného média.....	48
4.2.3. Pasážování a kultivace	49
4.3. Elicitace	49
4.4. Stanovení obsahu flavonoidů.....	50
4.5. Stanovení obsahu isoflavonoidů	51
4.5.1. Příprava vzorku	51
4.5.2. HPLC analýza	52
4.6. Statistické vyhodnocení	53
5. VÝSLEDKY.....	55
5.1. Tabulky	55
5.2. Grafy	58
6. DISKUSE	60
7. ZÁVĚR.....	63
8. SEZNAM LITERATURY.....	64

1. ÚVOD

Člověk může v průběhu svého života onemocnět různými chorobami. Je mnoho vážných chorob, jejichž vyléčení lze dosáhnout jen spoluprací lékařského týmu, využitím veškeré "ars medica" a nejnovějších farmaceutických preparátů. Pro mnohé z těchto nemocí však jsou k dispozici i bylinné recepty, které lze případně použít jako podpůrné, pokud s tím ovšem ošetřující lékař souhlasí. Žel, pro mnohé z těchto těžkých a vážných chorob není v oblasti bylinné léčby nic k dispozici. S léčivými rostlinami nelze léčit všechno, avšak lze léčit mnohé a mnohé zlepšit.

Mnoha nemocem se dá předejít užitím bylin v počátečním stádiu choroby, u mnoha chorob jsou byliny vhodnou doplňkovou léčbou, v jiných případech mohou byliny neutralizovat vedlejší vlivy chemických léků (antirevmatika, cytostatika). Tady je jejich velký ekonomický význam, neboť se pomocí bylin dá ušetřit výroba chemických léků, často s drahými dovozovými komponenty.

Nejvýznamnější oblastí je prevence. Uskutečňování prevence pomocí syntetických preparátů je zcela nemožné, neboť lidský organismus v dnešní době je zcela přeplněn chemickými látkami. V dávných dobách, kdy lidé měli přírodě blíž, neznali v podstatě jiné léčebné prostředky, než přírodní, a citlivě používali veškerá bohatství, která jim příroda nabízela sama.

Rostlinný materiál se získává buď sběrem planě rostoucích rostlin nebo z polních monokultur. Sběr nelze provádět v případě, že je rostlina chráněná. Planě rostoucí druhy často nemohou pokrýt spotřebu drog, hrozí také nebezpečí záměny a falšování drogy. Vyšlechtěné odrůdy dávají větší výnosy, mají vyšší obsah a konstantní složení obsahových látek. Nevýhodou větších monokultur je zvýšené nebezpečí škůdců a chorob, nelze se proto vyhnout použití pesticidů, které však mohou nepříznivě ovlivnit biosyntézu sekundárních metabolitů i znehodnotit rostlinu rezidui. Tyto problémy vedly k hledání alternativních způsobů získávání přírodních surovin.

V současnosti je věnována velká pozornost biotechnologickým metodám založeným na kultivaci rostlinných buněk a tkání. Kultivace explantátových kultur probíhá za řízených podmínek – bez závislosti na ročním období, klimatických podmínkách apod. Produkovaná biomasa je vysoce homogenní, sterilní a výhodou je i možnost kontinuální

produkce látek po celý rok.

Zvýšení produkce a akumulace sekundárních metabolitů v rostlinách pěstovaných běžným způsobem i v kulturách *in vitro* lze dosáhnout pomocí elicitace. Jde o metodu, která je založena na signálem (elicitem) indukované expresi genů, což vede k nárůstu hladiny metabolicky aktivních enzymů a následně i k zvýšení intenzity syntézy sekundárních metabolitů.

Problematikou elicitace explantátových kultur abiotickým elicitem (chloridem kademnatým) a vlivem různých koncentrací kademnatých iontů na tuto kulturu se zabývá i tato práce.

2. CÍL PRÁCE

2.1. Seznámit se s metodikou kultivace a elicitace rostlinných explantátových kultur *in vitro*.

2.2. Sledovat vliv působení různých koncentrací a doby aplikace abiotického elicitoru chloridu kademnatého na produkci sekundárních metabolitů suspenzními kulturami *Trifolium pratense* L. (variety DO-9 a SPRINT)

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. *Trifolium pratense* L. - jetel luční, Fabaceae (bobovité)

3.1.1. Botanický popis rostliny

Vytrvalá (u některých kulturních forem jen 2-3letá bylina) se silným, kulovým kořenem, který sahá i přes 60 cm hluboko do půdy, a s trsnatým oddenkem bez výběžků, z něhož vyrůstá přízemní růžice listů a přímé nebo vystoupavé, jednoduché nebo spoře rozvětvené, 20-50 cm vysoké, chlupaté a většinou trochu hranaté lodyhy o 3-5 člancích.

Všecky listy jsou trojčetné, spodní dlouze řapíkaté, hořejší s řapíky kratšími až přisedlé, s palisty vejčité kopinatými, s řapíkem listu vysoko srostlými, ostře špičatými a vně chlupatými. Listy jsou složeny z lístků 7-15 x 15-30 mm velikých, vejčitých až široce elipčitých, skoro celokrajných, na líci lysých a ozdobených příčnou, bělavou nebo červenohnědou skvrnou, vespod přitiskle chlupatých a na okraji brvitých.

Drobné, masově růžové, červené nebo řidčeji vybledlé až bílé kvítky skládají v počtu 30-60 hlávkovitá květenství 2-3 cm v průměru měřící, jež jsou kulatá nebo vejčitá, polozakrytá velkými palisty podpůrných listů. Na jedné lodyze bývají 1-3 květenství, rozmístěná tak, že postranní vyrůstají v paždí listů a hořejší je zdánlivě vrcholové. Pětčetné kvítky jsou přisedlé, bez listenců, 13-18mm dlouhé, přímé, složeny z 10žilného kalichu, který je krátce chlupatý a má dolní zub delší, zbarvený bělozeleně nebo načervenalé. Motýlovitá koruna je k dolejšku srostlá a horní její plátek čili pavéza je delší nežli oba postranní (křídla) a dva spodní jsou srostlé ve člunek.

Pestík mění se za plodu ve vejčitý, tence blanitý, jednosemenný lusk, otevírající se víčkem.¹ Semena nesouměrně srdcovitá, poněkud zploštělá, 1,5-2,0 mm dlouhá, 1,2-1,5 mm široká, žlutá až pískově hnědá. Kvete od května do září.²

3.1.2. Výskyt

Na lukách, v příkopech, ve světlínách lesních roste divoce a je také hojně pěstován na polích jako píce pro dobytek. Je to rostlina značně proměnlivá, která roste z roviny až do hor skoro v celé Evropě a v západní Asii, kde zasahuje na východ až k Altaji, Bajkalskému jezeru a do Kašmíru. V Severní a Jižní Americe a na Novém Zélandu roste jen zplaněle. Je to významná medonosná rostlina: dvacet milionů opylených květů dává 1 kg medu a 30 kg semene. Opylení obstarávají hlavně čmeláci a někteří motýli, neboť ostatní hmyz má většinou kratší sosák, než je zapotřebí. Pěstujeme-li jetel na semeno, poskytne nám při prvním sečení méně semene než při druhém, neboť na jaře je ještě málo čmeláků, takže opylení je špatné.¹





3.1.3. Odrůdy

Rostliny v ČR patří ke třem poddruhům, které bývají někdy hodnoceny jako odrůdy.

- Lodyhy s přitisklými, obvykle bělavými chlupy nebo olysalé
- Lodyhy s hustými, nestejně odstálými, obvykle rezavými nebo hnědými chlupy

Trifolium pratense subsp. americanum

- Lístky (1,0-) 1,5-3 cm dlouhé, lodyhy přitiskle chlupaté, plné 15-40 cm vysoké, poléhavé nebo vystoupavé; květenství většinou jednotlivá, 2,0-3,5 mm v průměru

Trifolium pratense subsp. pratense

- Lístky 4,0-5,0 (-7,0) cm dlouhé, lodyhy řídce přitiskle chlupaté až téměř lysé, duté, 40-70 (-100) cm vysoké, obvykle přímé; květenství často po dvou, 3-4 cm v průměru

*Trifolium pratense subsp. sativum*²

***Subsp. pratense* – jetel luční pravý**

Ekologie a cenologie: Louky a pastviny, lesní lemy. Optimum na čerstvých, živinami bohatých hlubokých půdách v oblastech s mírnými zimami a dostatkem srážek.

Rozšíření v ČR: V celém areálu druhu s výjimkou vysokohoří (max. Kralický Sněžník 1370 m)

Význam: Léčivka, pro obsah glykosidů, silic, tříslovin, organických kyselin a dalších látek bývají vykupována květenství bez palistů podpurných listů. Obsahové látky mají i květenství *subsp. sativum*

Subsp. sativum – jetel luční setý

Význam: *Trifolium pratense subsp. sativum* představuje jednu z nejvýznamnějších píceň. V Čechách se pěstuje od roku 1771. Kromě vlastní produkce zelené hmoty je významný zlepšováním kvality půdy.

Poznámka: Výhradně cizosprašná rostlina opylovaná především čmeláky; kultivary s kratšími květy mohou být opylovány i včelami. Vyšší produkce semen v podhůří než v nížinách je přičítána intenzivnější činnosti opylovačů.

Subsp. americanum – jetel luční americký

Trifolium pratense subsp. americanum bylo údajně vypěstováno v Severní Americe z rostlin anglického původu. K nám byl dovezen v 80. letech minulého století, v době nedostatku semen domácí provenience a byl pěstován ještě začátkem 20. stol. Později se od jeho pěstování upustilo, protože ho dobytek odmítal.²

Na poli se často zaměňuje s podobným druhem jetelem zvrhlým – *Trifolium hybridum* L., lidově nazývaným jetel švédský, který má listy bez charakteristických půlměsícovitých skvrn, hlávky jsou dlouze stopkaté, korunní lístky špinavě bílé až růžové. Elipsovité lusky obsahují až 4 drobná, nepravidelně srdčitá, zeleně až hnědě zbarvená semena.³

3.1.4. Sběr a úprava drogy

Trifolium pratense kvete od září do října. Jako droga se používají nerozpadlé hlávky – *Trifolii pratensis flos*. (Droga není oficiální v Českém lékopise 2005). Sbírají se v počátku květu. Překvetlé jsou bezcenné, protože při sušení hnědnou. Květy se mohou jeden den vystavit v jednoduché vrstvě přímému slunci a pak dosušit ve stínu a v průvanu. Přehrabáváním se hlávky snadno rozpadají a dávají bezcennou drť. Správně usušená droga zachová původní barvu nebo trochu ztmavne, ale nesmí být rezavá. Suší-li se uměle, nemá teplota překročit 35 °C. Drogu chráníme při skladování před světlem a vlhkem, rychle podléhá zkáze.⁴

3.1.5. Použití

V lidovém léčitelství se *Trifolium pratense* užívá při bronchitidě, cukrovce, proti průjmům a při revmatismu, také do obkladů při příušnicích. Je součástí řady potravních doplňků na zmírnění projevů menopauzálních obtíží, vhodné je i jako vonné a chuťové korigens do čajových směsí (aromatikum). Zevně se užívá jako dezinfekce kůže ve formě nálevů na hnisavé rány a ekzémy. Mladé listy jetele jsou podobně jako špenát užívány jako zelenina. Koupelí se též užívá proti revmatismu.

Droga z jetele nemá žádný vedlejší nežádoucí účinek a lze ji kombinovat s mátou, fenyklem, mateřídouškou nebo tymiánem. Kombinace s kořenem a listem pampelišky je vhodná jako metabolikum.^{4,5,6}

3.1.6. Obsahové látky

3.1.6.1. Isoflavonoidy

3.1.6.1.1. Všeobecné vlastnosti

Isoflavonoidy patří mezi rozsáhlou skupinu flavonoidů, sekundárních metabolitů

široce rozšířených v rostlinné říši. Všechny isoflavonoidy jsou barevné látky, které jsou zodpovědné za barvu květů a plodů.

Isoflavony společně s lignany, kumestany a stilbeny patří do skupiny fytoestrogenů.

3.1.6.1.2. Fytoestrogeny

jsou fenolické látky napodobující strukturu přirozených savčích estrogenů a vykazující slabou estrogení aktivitu. Pro lidskou populaci je hlavním zdrojem fytoestrogenů potrava.

Existence fytoestrogenů byla poprvé postulována a brzy také prokázána Bennetsem v roce 1946 v souvislosti s neplodností ovcí pasených dlouhodobě na pastvinách s velkým výskytem jetele podzemního (*Trifolium subterraneum*, *Fabaceae*). V roce 1954 z něj Bradbury a White izolovali genistein a formononetin, isoflavonoidy s estrogením účinkem. Neplodnost byla zjištěna nejprve u ovcí, jelikož hovězí dobytek je o mnoho méně citlivý vůči fytoestrogenům.

Někdy se isoflavonoidy a lignany označují jako fenolické fytoprotektanty (PPP, phenolic phytoprotectants).^{6,8}

3.1.6.1.3. Výskyt

Isoflavony jsou taxonomicky úzce rozšířeny v přírodě na rozdíl od ostatních všudypřítomných flavonoidů. Isoflavonoidy se vyskytují v převážné většině v rostlinách bobovitých (*Fabaceae*). Toto taxonomické omezení je spojeno pravděpodobně se závislostí na enzymu potřebném k přeskupení 2-fenylchromanu na 3-fenylchroman

(přeskupení z flavanonu na isoflavon).

Nejbohatším zdrojem je sója luštinatá (*Glycine max*, *Fabaceae*). Dalšími významnými zdroji jsou jetel luční (*Trifolium pratense*, *Fabaceae*), jetel plazivý (*Trifolium repens*, *Fabaceae*) a tolíce vojtěška (*Medicago sativa*, *Fabaceae*). Isoflavonoidy se vyskytují také v některých léčivých rostlinách jako je kručinka barvířská (*Genista tinctoria*, *Fabaceae*) a janovec metlatý (*Sarothamnus scoparius*, *Fabaceae*).

Z dalších čeledí třídy dvouděložných, u kterých byly objeveny isoflavonoidy, můžeme zmínit zejména *Rubiaceae* a *Passifloraceae*, popřípadě *Amaranthaceae*, *Chenopodiaceae*, *Cruciferae*, *Moraceae*, *Myristiceae*, *Rosaceae* a *Scrophulariaceae*. Ovšem výskyt isoflavonoidů v těchto čeledích je ojedinělý a potvrzen u jednoho rodu či druhu.

Isoflavonoidy se nacházejí nejen v rostlinách, ale také ve výrobcích z těchto rostlin. Tak byly zjištěny isoflavonoidy v malé míře i v bourbonu či v pivě.⁸

3.1.6.1.4. Historie a lidové léčitelství

Isoflavonoidy, resp. rostliny obsahující isoflavonoidy se používaly v mnoha kulturách po celém světě již mnoho staletí. Jejich význam byl ovšem velice rozdílný.

V Asii, kde tvoří jako obsahové látky sóji (*Glycine max*, *Fabaceae*) součást každodenního jídelníčku, je dnes chápeme nejvíce jako protektivní faktory proti nádorovým a kardiovaskulárním onemocněním.

3.1.6.1.5. Struktura, rozdělení

Isoflavonoidy patří mezi skupinu flavonoidů, strukturně se ovšem od ní liší základním 1,2-difenylpropanovým skeletem (C₆C₃C₆).

Isoflavonoidy jsou strukturně více rozmanité než ostatní skupiny flavonoidů a tvoří několik skupin, které se liší stupněm oxidace pyranového kruhu.

Vzhledem k velké strukturní rozmanitosti je i číslování struktur isoflavonoidů různé.

Nejrozsáhlejší skupinou isoflavonoidů jsou isoflavony a druhou nejpočetnější pterokarpany. Isoflavony jsou nejvíce redukována a kumestany nejvíce oxidovaná forma isoflavonoidů.

Isoflavonoidy se vyskytují jednak volné jako aglykony, jednak ve formě glykosidicky vázaných sloučenin. Ovšem ve srovnání s velkou skupinou glykosidů flavonů a flavonolů je skupina isoflavonoidních glykosidů malá. Nejčastějšími isoflavonoidními glykosidy jsou 7-glukosidy, 7-ramnosylglukosidy, méně pak 4'-glukosidy a 4'-ramnosylglukosidy. C-glykosidy se vyskytují spíše vzácně. ^{8,10}

3.1.6.1.6. Metabolismus a farmakokinetika

Absorpce isoflavonoidů je zahájena hydrolýzou esterové vazby glykosidů střevními bakteriálními β-glukosidázami, kyselinou chlorovodíkovou v žaludku nebo β-glukosidázami přítomnými v potravě. Působením antibiotik se blokuje téměř zcela přeměna rostlinných fytoestrogenů na jejich metabolity.

Po absorpci, která probíhá po celé délce střeva a pravděpodobně pasivní difúzí, jsou

volné aglykony transformovány na glukuronidy a sulfoglukuronidy, ovšem převládá transformace na glukuronáty. Tato reakce je katalyzována UDP-glukuronyltransferázou. Tyto konjugáty jsou podobně jako u endogenních estrogenů vylučovány močí, ale ne více než 50% a v menší míře stolicí. Eliminace močí probíhá ve dvou vlnách, ta druhá bývá vyvolaná pravděpodobně uvolněním isoflavonoidů z enterohepatální cirkulace. Tento proces je ostatně u metabolismu fytoestrogenů častý.

Po vyloučení do žluči mohou být konjugované isoflavonoidy znovu hydrolyzovány střevními bakteriemi. Dekonjugace pak může vést k opakované absorpci a degradaci v tenkém střevu.

Důležitým poznatkem je, že metabolismus isoflavonoidů, resp. fytoestrogenů je variabilní a individuální. V klinických testech se objevují podstatné rozdíly. Metabolismus isoflavonoidů závisí na řadě faktorů, jako je pohlaví, stáří, fáze menstruačního cyklu, dávka, doba expozice, apod.

Dlouhodobá expozice isoflavony způsobí u žen rychlejší metabolickou degradaci za vzniku neisoflavonových metabolitů (equol). Zvýšená produkce equolu, silnějšího a déle působícího estrogenu, než jsou isoflavony, může měnit a maskovat estrogení potenci isoflavonových prekurzorů konzumovaných v potravě.

3.1.6.1.7. Fyziologická role isoflavonoidů

Isoflavonoidy jsou slabé estrogény s *in vivo* aktivitou 100 – 1000× slabší než estradiol, ale mohou být v těle přítomny v koncentracích až 100× vyšších než endogenní estrogény.

Estrogení receptory existují ve dvou subtypech: dlouhou dobu známý typ ERa a v roce 1996 objevený typ ERb. Isoflavonoidy se váží na estrogení receptory a působí tak jako slabé estrogény (hormone like effect), ovšem zároveň mohou narušovat funkci

endogenních estrogenů v lidském organismu.

Princip antiestrogenního působení je založen také na stimulaci biosyntézy sexuálního globulinu (SHBG) v játrech. Vyšší hladiny SHBG jsou protektivním faktorem proti nadměrnému působení estrogenů i androgenů v cílové tkáni. Stimulační účinek se odehrává na posttranskripční úrovni stabilizací SHBG-mRNA.

Účinek může být proto někdy estrogení a někdy antiestrogení, ale ani u maximálních koncentrací dosažitelných příjmem potravy není příliš dramatický.

Účinek isoflavonoidů se neprojevuje pouze prostřednictvím estrogeních receptorů, ale mohou ovlivňovat různé enzymy, syntézu proteinů, transport vápníku, oxidaci lipidů, diferenciaci buněk nebo účinek růstových faktorů.

Isoflavonoidy vykazují široké spektrum biologické aktivity:

- Estrogení aktivita
- Antioxidační aktivita
- Antiosteoporotická aktivita
- Inhibující angiogenezi
- Antiatherogenní
- Hypocholesteromické
- Antibakteriální
- Insekticidní
- Antifungální
- Imunosupresivní⁸

Kardiovaskulární onemocnění

Isoflavonoidy mohou mít pozitivní vliv na srdeční onemocnění působením na estrogení receptory, ale také snižováním koncentrace lipidů a lipoproteinů v plazmě.

Isoflavony sóji mohou stabilizovat LDL lipoproteiny proti oxidaci, o níž se předpokládá, že probíhá v arteriích a je považována za jednu z možných příčin vzniku aterosklerózy. Na lipidové spektrum mají příznivější vliv spíše nižší dávky než příliš vysoké dávky isoflavonů.

V prevenci aterosklerózy hrají významnou roli isoflavonoidy i vzhledem ke zlepšení vasodilatace u žen v postmenopauze.

Isoflavonoidy jsou také studovány jako zhášedce volných radikálů, zejména genistein a equol, jejichž aktivita je srovnatelná s kvercetinem.

Nádorová onemocnění

U isoflavonoidů byly prokázány protektivní účinky vůči mnoha nádorům. Jedná se zejména o hormon dependentní tumory.

Hlavní mechanismus protektivního účinku isoflavonoidů je ve snížení koncentrace endogenních estrogenů. Isoflavony sóji potlačují syntézu estrogenů a mění jejich metabolismus směrem od genotoxických metabolitů k metabolitům inaktivním.

Ovšem i jiné mechanismy mají velký význam. Mnohdy klíčovým mechanismem bývá inhibice enzymů, které jsou spojeny s růstem buněk (ornithindekarboxyláza, tyrosinproteinkináza, DNA-topoisomeráza I a II a histidinproteinkináza), nebo enzymů řídících produkci estronu z androgenů (aromatáza). Dle nejnovějších poznatků se při kolorektálním karcinomu uplatňuje i mechanismus aktivace enzymů, jako je NADPH-chinonreduktáza, která chrání buňky proti mutagennímu a karcinogennímu účinku volných radikálů.

Obecně se dá říci, že existuje dostatečné množství důkazů pro použití isoflavonoidů jako účinných látek k léčbě rakoviny prostaty. Zde mají význam biochanin A, daidzein a

genistein. Význam při léčbě onemocnění prostaty má i inhibiční vliv na 5 α -reduktázu, enzym, který zajišťuje přeměnu testosteronu na dehydrotestosteron.⁸

3.1.6.2. Flavonoidy

3.1.6.2.1. Všeobecné vlastnosti flavonoidů

Flavonoidy jsou v rostlinné říši velmi rozšířeny, jedná se o ve vodě rozpustná barviva, zodpovědná za barvu květů, plodů a někdy i listů. První zástupci, kteří byli podrobně zkoumáni, byli nápadní svojí žlutou barvou. Odtud je také odvozen název z latinského slova flavus znamenající žlutý. Žluté mohou být chalkony, aurony a flavonoly. Také modrá, červená nebo purpurová barva je odvozena od struktury flavonoidů, přesněji anthokyanů.

Uložení flavonoidů v rostlinném organismu je druhově závislé. Všeobecně však platí, že ve vodě rozpustné glykosidy jsou nejčastěji uloženy ve vakuolách. Mohou být ukládány pouze do buněk epidermis listu nebo současně do epidermis i mezofylu listu. Oba typy tkání mohou kumulovat odlišné typy flavonoidů. Aglykony nejčastěji nacházíme v kutikule listů, protože aglykony jsou lipofilnější (hydroxylové skupiny ve struktuře sloučeniny jsou částečně nebo úplně methylované) a tím pádem lépe rozpustné ve voskové vrstvě na povrchu listu. V květech jsou flavonoidy uloženy v epidermálních buňkách.

Flavonoidy se vyskytují také v oplodí plodů a semenech, dokonce v pylových zrnech. Wiermann v roce 1970 dokázal flavonolové glykosidy ve vnější vrstvě buněk stěny pylového zrna.

Methoxylované deriváty jsou lipofilní a vyskytují se v silicích.^{9,10}

3.1.6.2.2. Chemická struktura

Flavonoidy se objevují jak ve formě volné, tak ve formě glykosidicky vázaných sloučenin. Přibližně je známo asi 3000 těchto sloučenin a okolo 500 je ve volné formě. Všechny flavonoidy mají společnou základní strukturu odvozenou od chromanu s fenylem připojeným v poloze 2, isoflavonoidy mají fenyl v poloze 3 a neoflavonoidy v poloze 4.

3.1.6.2.3. Funkce v rostlinném organismu

Flavonoidy nemusí být vždy barevné, ale mohou přispívat k zbarvení jako kopigmenty, například jako flavonové a flavonolové kopigmenty chránící anthokyany. V některých případech absorbují záření blízké UV a výsledná barva je vnímána pouze hmyzem. Flavonoidy jsou přítomny také v kutikule listů a epidermálních buňkách, kde chrání pletiva před ničivým účinkem UV záření.

Antioxidanty

Flavonoidy ochraňují rostlinu před nadměrným UV zářením, při kterém se uvolňuje velké množství reaktivních forem kyslíku. Flavonoidy mohou přímo zhaset superoxid, hydroxylový radikál, singletový kyslík. Ale protože jsou převážně lokalizovány ve vakuole, je velmi nepravděpodobné, že by zasahovaly přímo proti vysoce reaktivním formám kyslíku, které jsou uvolňovány z chloroplastů při fotosyntéze. Reagují s peroxidem vodíku, který je stabilní a je schopen difundovat přes membránu.

Inhibitory enzymů

Studie sledovaly inhibiční vliv flavonoidů na řadu jiných rostlinných enzymů např. malátdehydrogenázu, glutamátdekarboxylázu.^{9,10}

Barviva

Je všeobecně známo, že různá barva, vůně a tvar květů přitahuje jiný typ opylovačů. Vztah mezi barvou květů a typem opylovače je alespoň částečně závislý na obsahu flavonoidů. Z empirických i vědeckých pozorování vyplynulo, že hmyz je citlivý na barvu flavonů a flavonolových glykosidů absorbujících blízko 350 nm a na žluté flavonoidy jako jsou chalkony, aurony, 3-deoxyanthokyaniny nebo flavonoly s hydroxylovou nebo methoxylovou skupinou v poloze 6, 8. Na základě barevného vidění hmyzu se zjistilo, že včely všeobecně preferují žlutou a modrou barvu květů, motýli si libují v růžové nebo bílé, můry láká bílá a pro ptáky je atraktivní červená.

Některé typy flavonoidů nejsou důležité jenom z hlediska opylování rostlin, ale sehrávají roli v regulaci růstu a vývoje rostliny.

3.1.6.2.4. Biologická aktivita

V živém organismu se pravděpodobně zapojují do oxidačně-redukčních procesů, mají schopnost normalizovat permeabilitu kapilár, pravděpodobně díky svému působení na metabolismus arachidonové kyseliny vykazují protizánětlivou a antialergickou aktivitu, dále i antitrombotické a vasoprotektivní účinky. Mnoho rostlin obsahující flavonoidy (petržel, lékořice) působí jako diuretika a spasmolytika. Mají také antimutagenní účinek, zabraňují výskytu zubního kazu, mají i protinádorový účinek. V případě popálenin a poškození pokožky flavonoidy stimulují tvorbu epitelu.

O fyziologických účincích flavonoidů je důležité vědět, že působí především v zažívacím traktu a v cévním systému. Inaktivují volné radikály, ve fosfolipidové vrstvě biomembrán inhibují peroxidaci lipidů, snižují oxidační poškození LDL, a tím také riziko vzniku aterosklerozy. Zabraňují agregaci trombocytů, snižují tvorbu trombů (krevních sraženin). Zvyšují stabilitu cévních stěn. Napomáhají regeneraci vitamínu C a β -karotenu, snižují hladinu sérových triglyceridů. Mají hepatoprotektivní účinek a taktéž zabraňují nepříznivému účinku slunečního záření. Z dlouhodobého hlediska snižují komplikace v

souvislosti s cukrovkou. Mají i antivirové, antibakteriální a protialergické účinky.⁹

Jejich schopnost redukce souvisí s počtem nenasycených vazeb na základním jádře sloučenin, resp. s oxidačně-redukčním potenciálem a počtem hydroxylových skupin lokalizovaných v různých polohách základní struktury flavonoidů. Svůj antioxidační účinek můžou vyvíjet i nepřímo prostřednictvím tvorby komplexů s kationty kovů, které potom nevstupují do reakcí, jejichž výsledkem je produkce volných radikálů.

Příznivě ovlivňují propustnost cév a kapilár, proto se úspěšně používají ve farmakoterapii nemocí spojených s kapilárním krvácením (krvácení sítnice, ledvin atd.)¹⁰

Flavonoidy vykazují i tyto aktivity:

estrogenní aktivita

spasmolytická aktivita

antimikrobiální a antivirální aktivita

antihemorhagická aktivita

antiedematosní účinek

antioxidační aktivita

antimutagenní aktivita

brání srážení krve

zadržují vápník v těle

choleretické účinky

napomáhají regeneraci vitamínu E^{9,10,27}

3.1.6.2.5. Biosyntéza

V rostlinách vznikají flavonoidy kondenzací polyacetátu a aromatických aminokyselin jako je fenylalanin a tyrosin. Tyto sloučeniny vznikají v biosyntetické cestě kyseliny šikimové.

L-fenylalanin je přímým prekurzorem kyseliny skořicové a enzymem zodpovědným za konverzi je fenylalaninamoniaklyáza. Při této reakci dochází k stereospecifické eliminaci amoniaku a vzniká kyselina trans-skořicová.

Hydroxylaci kyseliny trans-skořicové na kyselinu p-kumarovou (4-hydroxyskořicovou) katalyzuje enzym trans-cinnamoyl-4-monooxygenáza, cytochrom P-450-dependentní monooxygenáza. Tady se opět biosyntetická cesta větví a může pokračovat až k ligninu.

Další klíčovou roli sehrává enzym 4-kumaroyl-CoA-ligáza, který z kyseliny p-kumarové společně s ATP a CoA vytváří 4-kumaroyl-CoA.

V další fázi reagují 3 molekuly malonyl-CoA s p-kumaroyl-CoA za spolupůsobení chalkonsyntázy a vzniká chalkon.

Chalkony v roztoku samovolně cyklizují na příslušné flavanony. V rostlinném organismu je tento krok řízen enzymem chalkonisomerázou a ze žlutě zbarveného 4,2',4',6'-tetrahydroxychalkonu vzniká stereospecifickou izomerací bezbarvý flavanon - naringenin. V tomto stupni syntézy dochází k celé řadě dalších enzymaticky řízených kroků.

Působením blíže nespecifikovaných oxidoreduktáz vznikají flavony, např. apigenin nebo různě hydroxylované flavanony.

Z naringeninu působením enzymu isoflavonsyntázy vychází biosyntéza

isoflavonoidů.

Od naringeninů je odvozena syntéza dihydrokempferolu působením enzymu naringenin-3-dioxygenáza. Z dihydroxykempferolu pokračuje biosyntetická cesta dále k cis-flavan-3,4-diolu. V této cestě hrají roli dva důležité enzymy dihydroflavonol-4-reduktáza, produktem je cis-3,4-leukopelargonidin a další oxidoreduktázou se dostáváme až k anthokyanidinům, vzniká cihlově červený pelargonidin. Z dihydromyricetinu se odvozuje modrý delphinidin a červený cyanidin, který je odvozen z dihydrokvercetinů.⁹

3.2. Rostlinné kultury *in vitro*

Vyšší rostliny jsou důležitými zdroji léčivých látek. Jednou z možností, jak se vyhnout obtížím se zajištěním těchto látek, je kultivace rostlinných tkání a buněk *in vitro*. Využití kultur *in vitro* lze rozdělit na dvě oblasti, ve kterých je nejintenzivněji prováděn výzkum, který má i své praktické uplatnění. Jde o problematiku biotechnologických metod v rozmnožování a šlechtění rostlin a o produkci sekundárních metabolitů těmito kulturami, kterou lze ovlivnit například využitím prekurzorů požadovaných metabolitů, biotransformací nebo procesem elicítace. Využití kultur *in vitro* jako zdroje důležitých rostlinných metabolitů pro farmacii, potravinářství, kosmetiku a zemědělství se jeví jako velmi perspektivní.^{11,12}

3.2.1. Obecná charakteristika

- **Diferenciace** – chemické a strukturální změny v jednotlivých buňkách a pletivech spočívající v aktivaci i inaktivaci určitých genů, jimiž se odlišily od tzv. eumeristemického stavu a získaly jinou specializaci. Opačný proces je nazýván dediferenciace.
- **Intaktní rostlina** – původní rostlina pěstovaná v přirozených podmínkách
- **Kalus, zával, svalec** – v původním významu neorganizované pletivo, vzniklé činností sekundárních meristémů po poranění rostliny, v přeneseném významu pletivo, které vzniká na povrchu nenádorových primárních explantátů a je schopné subkultivace
- **Kultivace *in vitro*** – pěstování rostlinného materiálu v podmínkách co nejúplněji definovatelných po stránce chemické i fyzikální a zabraňujících nežádoucí kontaminaci cizorodými živými organismy a buňkami

- **Kultura rostlinných explantátů** – rostlinné explantáty pěstované po určitou dobu v podmínkách *in vitro*. Kultury rostlinných explantátů lze podle morfologické charakteristiky zařadit do některé z následujících pěti kategorií:
 1. *Kultura orgánová* – orgánové systémy, orgány resp. jejich základy nebo části pěstované v podmínkách *in vitro* způsobem, který umožňuje diferenciaci a částečně zachovává i jejich stavbu a funkci.
 2. *Kultura tkáňová* – do různého stupně soudržné, morfologicky dezorganizované mnohobuněčné komplexy tkáně, pomnožované buď na polotuhých či pevných nosičích, nasycených živným médiem nebo výjimečně v tekuté živné půdě.
 3. *Kultura suspenzní* – volné buňky a buněčné shluky společně pomnožované, suspendovány v tekuté živné půdě, promíchávané a provzdušňované.
 4. *Kultura buněčná* – volné jednotlivé buňky, resp. jejich nejbližší potomstvo, pomnožované v tekuté či polotekuté půdě nebo na nosiči nasyceném živnou půdou.
 5. *Kultura protoplastů* – kultura buněk zbavených buněčných stěn, kde buněčný obsah je obalen nikoliv pevnou buněčnou stěnou, ale jen pružnou elastickou plasmalemou.
- **Primární explantát** – rostlinný explantát odebraný přímo z intaktní rostliny.
- **Primární kultura** – kultura primárních explantátů
- **Subkultivace, pasážování** – přenos celé kultury nebo její části (inokula) do čerstvé živné půdy s cílem obnovit, zachovat nebo zesílit růst kultury po další subkultivační interval. *Subkultivační interval* je doba mezi dvěma pasážováními.

Subkultivační číslo udává, kolikrát byla kultura pasážována.

- **Rostlinný explantát** – každý fragment živého pletiva, celý orgán nebo komplex orgánů, odebraný buď z intaktní rostliny, nebo z již existující kultury s cílem pěstovat jej v podmínkách *in vitro*.
- **Rozpadavost kultur** – schopnost tkáňových či suspenzních kultur spontánně se rozpadat na buněčné shluky a volné buňky, schopné dalšího růstu, resp. pomnožování.
- **Totipotence** – schopnost rostlinných buněk kultivovaných *in vitro* obnovit v průběhu diferenciačních procesů specializované funkce a postupně regenerovat ve fertilní rostlinu; umožňuje realizace genetických měn vyvolaných v jednotlivých buňkách na úrovni celého organismu.^{13,14}

3.2.2. Vlastnosti kultur rostlinných explantátů

- Rostlinné kultury lze odvodit z buňky či komplexu buněk pletiva kteréhokoliv orgánu rostlinného těla (s výjimkou některých velmi specializovaných buněk, např. sítkovice, sklereidy).
- Vhodnou kombinací růstově aktivních látek a ostatních složek kultivačního média lze v kulturách indukovat histogenezi nebo organogenezi, takto je možné odvodit z jedné somatické buňky životaschopnou rostlinu.
- Kulturu lze pěstovat *in vitro* za vhodných kultivačních podmínek neomezeně dlouho.
- Orgánové, tkáňové ani buněčné kultury nejsou schopny bez poškození podstoupit

konzervaci mrazem.

- Tkáňová a suspenzní kultura se v průběhu růstu *in vitro* dediferencuje, ztrácí svůj původní morfologický a fyziologický charakter, není však homogenní, obsahuje buňky různého stupně diferenciaci.
- Explantátové orgány, resp. orgánové základy v kultuře *in vitro* mohou dorůstat.
- Suspenzní kultury jsou tvořeny volnými buňkami a jednotlivými buněčnými shluky, poměr volných buněk a buněčných shluků se v průběhu kultivace může měnit; rozpadavost kultury je zřejmě geneticky podmíněna a lze ji ovlivnit složením média a kultivačními podmínkami.
- Řada rostlinných kultur je schopna trvale růst na plně syntetických půdách, často velmi jednoduchých.
- Buňky tkáňových ani buněčných kultur nejsou schopny tvořit jednovrstevnou kulturu (monolayer), neuchycují se na tuhé ani na polotuhé podklady.¹³

3.2.3. Etapy kultivace explantátových kultur

Cílem práce je získat sterilní rostlinný materiál s vysokou produkcí metabolitů. Prvním krokem je výběr vhodné matečné rostliny. Explantátové kultury rostlin znamenají aseptickou kultivaci izolovaných částí rostlin za umělých podmínek. V praxi to znamená oddělit ze sterilně napěstované nebo povrchově sterilizované rostliny určitou část, umístit ji do sterilního prostředí a kultivovat za více či méně definovaných podmínek. Výchozí rostlina by měla být zdravá, pěstovaná v optimálních podmínkách. Nejlepších výsledků je dosaženo, je-li explantát odebrán z rostliny v aktivní fázi růstu anebo ze zásobních orgánů. Z povrchově sterilní nebo asepticky pěstované rostliny se fragment některého orgánu umístí do kultivační nádoby s vhodným sterilním živným médiem a inkubuje se při 23-28 °C. Typ vývoje explantátu a intenzita proliferace je ovlivněna kultivačními podmínkami a složením média. Po několika týdnech se objeví primární kalus, který je schopen se rozmnožovat na novém médiu.

Získaný kalus je schopen neomezené proliferace na vhodném médiu po odstranění zbytku výchozího orgánu. U prvních pasáží se mohou objevit morfologické a morfogenetické změny. Teprve po větším množství pasáží se získá stabilní a homogenní rostlinný materiál, ovšem pouze za předpokladu přísného dodržování konstantních podmínek kultivace, jako je složení a zpracování živné půdy, teplota, osvětlení, prostředí a pravidelnost pasáží.

Z kalusové kultury lze enzymatickým nebo mechanickým způsobem odvodit kulturu suspenzní. V prvním případě se používají vhodné pektinázy, ve druhém pomaloběžné rolery a třepačky.

Ve svém principu zahrnují rostlinné explantátové kultury izolaci buněk, pletiv a orgánů a jejich kultivaci ve sterilních podmínkách řízeného prostředí. Vegetační vrcholy, postranní pupeny, části stonků, listů, kořene, reprodukční části jako mikrospory, vajíčka, embrya, semena nebo spory, jakož i jednotlivé buňky a protoplasty mohou být krátkodobě kultivovány *in vitro* a za určitých podmínek dopěstovány v nové rostliny. To umožňuje

uskutečnění cyklu rostlina – explantát – kultura *in vitro* – organogeneze nebo embryogeneze – intaktní rostlina.

Pro úspěšnou kultivaci rostlinných kultur je důležité najít optimální složení živného média a připravit vhodné fyzikální podmínky.^{13,14}

3.2.4. Podmínky kultivace rostlinných explantátů

Optimální růst, ale i produkce sekundárních metabolitů jsou ovlivněny volbou vhodných podmínek.

3.2.4.1. Složení živných médií

Složky živných půd se podle množství v půdě resp. svého charakteru nebo fyziologických účinků rozdělují do následujících skupin:

- **Makroelementy** – jsou nezbytné pro kultivaci intaktních rostlin, jedná se o dusík, síru, fosfor, hořčík, vápník a draslík. Optimální koncentrace každého prvku pro dosažení maximální růstové rychlosti je značně závislá na rostlinném druhu. Přidávají se do živné půdy ve formě solí, jejich koncentrace v médiu je vyšší než 30 mg/l.
- **Mikroelementy** – zahrnují železo, bor, mangan, zinek, měď a molybden. Železo a zinek se obvykle do médií dodávají v chelátové formě. Do médií se také někdy dodává kobalt, jód, sodík a chlór, ale nemusí být pro růst explantátové kultury nezbytné. Význam niklu, kobaltu a hliníku pro růst kultivovaných rostlinných tkání je zatím sporný.
- **Zdroj uhlíku** – cukry, alkoholy, organické kyseliny. Jsou základní stavební jednotkou pro nově vznikající pletiva. Pro většinu rostlinných kultur je nejvhodnější sacharóza v koncentraci 2 – 5%. V některých případech je možné

sacharózu nahradit glukózou či fruktózou. Alkoholy nemají pro tkáňové kultury takový význam jako cukry. Jako uspokojující zdroj uhlíku může sloužit glycerin. Jiné alkoholy jsou již méně účinné, některé jsou neúčinné nebo jsou dokonce toxické (propanol, butanol). Ani organické kyseliny nejsou ideální, příznivý vliv na růst kultury byl zjištěn jen u kyseliny jablečné. Sacharóza přítomná v médiu může být rozštěpena na glukózu a fruktózu. K částečné hydrolýze sacharózy dochází také při autoklavování média.

- **Prostředky pro odpěňování živných pūd** – jsou rostlinné oleje – sojový, řepkový, kokosový, slunečnicový, hořčičný, dále živočišné tuky – lůj, dezodorizovaný rybí tuk, tekutá frakce vepřového sádla a silikonové oleje – jako vodná emulze s obsahem 10% silikonu. Tyto prostředky jsou důležité především ve výrobě.
- **Vitamíny** – jsou pro rostlinu nezbytné jako katalyzátory řady metabolických procesů. Pro rostlinné buňky a pletiva kultivovaná *in vitro* mohou být některé vitamíny limitujícím faktorem jejich růstu. Mezi vitamíny nejčastěji používané v živných médiích patří thiamin, kyselina nikotinová, pyridoxin a myoinositol. Thiamin se používá obvykle v koncentraci 0,1 – 10,0 mg/l. Je součástí většiny médií a je pro růst tkáňových kultur nepostradatelný. V kultivačních médiích se někdy používají další vitamíny jako biotin, kyselina listová, kyselina askorbová, kyselina pantotenová, riboflavin a další. Jejich přítomnost však není většinou nezbytná.
- **Aminokyseliny** – slouží buňkám jako bezprostřední zdroj dusíku nebo mohou být přímo využívány k syntéze proteinů. Jejich přirozené směsi (např. hydrolyzát kaseinu) působí příznivě na růst a vývoj explantátu, podporují také organogenezi. Dodávají se do živných médií především v případě kultivace buněčných suspenzí a protoplastů. Pokud se dodávají aminokyseliny samotné, je nutné mít na zřeteli, že mohou při vyšších koncentracích také inhibovat růst. Koncentrace stimulující růst závisí na druhu aminokyseliny. Nejčastěji se používá koncentrace v rozsahu 1-100 mg/l.

- **Nedefinované směsi přírodních látek** – růst explantátové kultury je možné stimulovat přidáním celé řady organických extraktů jako např. protein hydrolyzátu, kokosového mléka, kvasničného extraktu, sladového extraktu, extraktů z banánu, koňského kaštanu, vlašského ořechu, kukuřice, pšenice, pomerančové či rajčatové šťávy. V současné době se dává přednost definovaným kombinacím látek a tím se přechází ke skutečně syntetickým médiím. Do médií se také někdy dodává aktivní uhlí, které může mít jak stimulační, tak inhibiční efekt na růst explantátů.
- **Látky používané pro zpevnění média** – pro přípravu tuhých médií se nejčastěji používá agar, který má oproti jiným látkám řadu výhod. Agarové gely jsou stabilní při kultivačních teplotách, agar nereaguje s ostatními složkami média a není rozkládán rostlinnými enzymy. Tuhost svarového gelu je možno regulovat použitou koncentrací agaru, druhem agaru a pH média. V případě, že není použito pevné médium, je možné explantáty fixovat na můstcích z filtračního papíru, polyuretanové pěně, čedičové vatě nebo perforovaném celofánu.
- **Růstové regulátory** – rostlinné buňky jsou při pěstování *in vitro* většinou závislé na přítomnosti růstových regulátorů, protože syntéza endogenních růstových regulátorů (fytohormonů) není pro zajištění růstu dostatečná. Pro účely kultivace lze růstové regulátory rozdělit do tří základních skupin:
 1. *Auxiny*: mezi auxiny používané v tkáňových kulturách rostlin patří především kyselina β -indolyloctová (IAA), kyselina β -indolyl-4-máselná (IBA), kyselina 2,4-dichlorfenoxycetová (2,4-D) a kyselina α -naftyloctová (α -NAA). V kultivačním médiu jsou používány především za účelem stimulace růstu kalusu a buněk. V některých případech k indukci tvorby prýtu a zejména kořenů.
 2. *Cytokiny*: nejdůležitějšími přírodními cytokiny jsou zeatin a 6- izopentenylaminopurin

a syntetickými 6-furfurylaminopurin (kinetin) a 6-benzylaminopurin (BA). Používají se ke stimulaci buněčného dělení a k indukci tvorby axilárních prýtů.

3. *Gibereliny*: hlavními zástupci jsou kyselina giberelová (GBA) a giberelin. Přidávají se do média většinou za účelem stimulace růstu buněčných kultur, kalusů a zakrslých rostlin.^{13,14}

3.2.4.2. Fyzikální podmínky kultivace

Jedním z předpokladů úspěšného pěstování rostlin *in vitro* je jejich adaptabilita na podmínky kultivace dané kultury. Z fyzikálních faktorů sem lze zařadit osvětlení, teplotu, pH živného média, vlhkost vzduchu aj.

- **Světlo** – působením světla často dochází v intaktních rostlinách i tkáňových kulturách ke změně intenzity biosyntézy a k akumulaci sekundárních metabolitů. Stejný vliv má i světlo na orgánovou diferenciaci. Světlo také může být induktorem některých biosyntéz, např. syntézy flavonoidů a anthokyanů. Pozitivní vliv světla byl dále prokázán u kultur produkujících digitoxin a diosgenin. Je znám i vliv světla o různých vlnových délkách na produkci sekundárních metabolitů.
- **Teplota** – kultivační teplota je jedním z faktorů, který ovlivňuje průběh kultivace tkáňových kultur. Většinou je empiricky zvolena v rozmezí okolo 23-28 °C. Její hodnota má vliv na rychlost růstu kultury a její zvýšení může indukovat organogenezi. Pokud je teplota příliš nízká, rychlost metabolismu se zpomalí, až zastaví, pokud je příliš vysoká, dochází k poškození buněk.
- **pH živného média** – u rostlinných tkání není bezpodmínečně nutná přesná hodnota pH živného média. Optimální hodnota závisí na typu kultury. Pro většinu kultur *in vitro* se doporučuje hodnota pH od 5,5 do 6,0. Na tyto hodnoty se v případě potřeby upravují půdy přidávkem kyseliny chlorovodíkové či hydroxidu sodného.

- **Vlhkost vzduchu** – bývá nastavena na hodnoty v rozmezí 20 – 98% podle požadavků dané kultury.¹³

3.2.5. Produkce sekundárních metabolitů

Vyšší rostliny jsou bohatými zdroji léčivých látek. Jednou z možností, jak se vyhnout obtížím se zajištěním těchto látek, by mohlo být zavedení systému buněčných kultur pro jejich produkci.

Hlavní výhody buněčné kultivace oproti kultivaci celé rostliny jsou následující:

1. Buňky jakékoliv rostliny, bez ohledu na její geografický původ, mohou být snadno pěstovány k získání jejich specifických metabolitů.
2. Sekundární metabolity mohou být produkovány za kontrolovaných podmínek a v prostředí nezávislém na klimatických změnách nebo půdních podmínkách.
3. Automatická kultura buněčného růstu a racionální regulace metabolických procesů může přispět ke snížení pracovních nákladů a ke zvýšení produktivity.
4. Rostlinné explantáty jsou pěstovány sterilně, bez použití ochranných prostředků a hnojiv.

3.2.6. Biotechnologické využití rostlinných explantátových kultur

V posledních letech nastal významný pokrok ve vývoji nových technik, kterými je možné dosáhnout zvýšení produkce a akumulace sekundárních přírodních látek v buněčných kulturách *in vitro*. Jde například o elicitaci, biotransformaci, imobilizaci.

Úspěšných výsledků ve využívání rostlinných buněčných kultur pro tvorbu sekundárních přírodních látek bylo také dosaženo zejména postupy založenými na manipulacích se složením živného média, také díky rozvoji metod klonování.

Perspektivní je i přenos rostlinných genů, které kódují enzymy katalyzující reakce biosyntézy sekundární látky do bakteriální buňky nebo do buňky mikroskopických hub.

Přes dosažené úspěchy zůstává stále nevyřešena celá řada problémů, které stojí v cestě využití tkáňových kultur pro produkci sekundárních metabolitů. Zřejmě nejzávažnějším je nízký obsah žádaných látek, kombinovaný s často se vyskytující nestabilitou produkce.¹²

3.2.7. Fáze růstu kultury

Rostlinná kultura během růstu prochází několika fázemi. Jednotlivé fáze jsou charakterizovány růstovou křivkou, která vyjadřuje závislost koncentrace biomasy na čase. Délka fáze závisí na složení živného média, fyzikálních faktorech a na typu a stáří buněk, jejich množství a genetickém vybavení.^{13,14}

1. *lag fáze* – období přizpůsobení se naočkovaných buněk na nové prostředí. Po umístění buněk do živného média je jejich koncentrace po určitou dobu konstantní nebo může přechodně klesnout.
2. *fáze zrychlení (akcelerační)* - všechny důležité enzymové reakce postupně dosahují maximálních konstantních rychlostí a přecházejí do ustáleného stavu.

3. *exponenciální fáze* – buňky rostou stále stejnou maximální rychlostí, buňka se z hlediska chemického složení nemění. Fáze trvá tak dlouho, pokud mají buňky dostatečné množství živin a pokud není růst buňky inhibován produkty vlastního metabolismu.
4. *fáze zpomalení (deklinační)* – s postupným vyčerpáním živin a hromaděním metabolických produktů dochází k poklesu růstové rychlosti. V této fázi se může tvar růstové křivky velmi lišit, což záleží na typu rostlinné kultury.
5. *stacionární fáze* – populace buněk dosahuje maximální a po určitou dobu konstantní velikosti, doba této fáze závisí stejně jako u předchozí fáze na způsobu měření koncentrace buněk. Maximální dosaženou koncentraci buněk určuje řada faktorů; počáteční koncentrace energetického zdroje, zdroje dusíku a stopových prvků, koncentrace kyslíku, způsob úpravy pH během kultivace.
6. *fáze odumírání* – pro průběh fáze neexistuje žádné pravidlo, odumírání rostlin může být pomalé nebo rychlé, spojené nebo nespojené s autolýzou buněk.¹²

3.3. Elicítace

3.3.1. Charakteristika elicítace

Jednou z metod, které lze využít ke zvýšení produkce sekundárních metabolitů v rostlinách je elicítace. Rostliny se stejně jako ostatní organismy musí vyrovnat s nepříznivými vlivy životního prostředí. Tyto nepříznivé vlivy, které svou intenzitou překračují hranici tolerance, se nazývají stresové faktory (stresory). Nejdůležitější z nich jsou uvedeny v následujícím přehledu:

- **Abiotické faktory:**

Fyzikální: mechanické účinky větru
nadměrné záření (UV, viditelné)
extrémní teploty (horko, chlad, mráz)

Chemické: nedostatek vody (sucho)
nedostatek kyslíku (hypoxie, anoxie)
nedostatek živin
nadbytek iontů solí a vodíku v půdě
toxické kovy a organické látky v půdě
toxické plyny ve vzduchu

- **Biotické faktory:** herbivorní živočichové (spásání, poranění)
patogeny (viry, bakterie, houby)
vzájemné ovlivňování (alelopatie, parasitismus)

Rostliny si proti stresu vytvořily rozmanité obranné mechanismy. Pasivní (dlouhodobý) způsob ochrany je založen na zamezení (nebo alespoň výrazném omezení) průniku stresových faktorů do vnitřního prostředí rostliny. K tomuto účelu slouží

především speciální anatomické ochranné struktury (trny, ostny, trichomy, ztlustlá kutikula, impregnovaná buněčná stěna). Jiné rostliny využívají vhodného načasování životních cyklů či vytváření rezervoárů vody a akumulace zásobních látek.

Pronikne-li stresor k plazmatické membráně buněk a do symplastu, je jeho negativní dopad omezen spuštěním mechanismů aktivní odolnosti. Průběh této stresové reakce a její konečný výsledek závisí na charakteru, intenzitě a délce působení stresového faktoru (či faktorů), jednak na geneticky zakódovaných (adaptačních) i přechodných - indukovaných schopnostech napadených rostlin.

Atakům ostatních organismů se jednotlivé rostlinné druhy brání několika způsoby:

- mechanické struktury (trny, žahavé trichomy)
- produkce toxických látek (látky nespecifické, produkované i bez přítomnosti patogenů – fytoncidy)
- hypersenzitivní reakce (v místě napadení škůdcem vzniká obranná nekróza, uvnitř ložiska byly prokázány nízkomolekulární antibioticky účinné produkty látkové výměny rostlin, tzv. fytoalexiny)
- tvorba fytoalexinů (syntéza je závislá na kontaktu s patogenem, signál, který vydává škůdce, označujeme jako elicitor, tato reakce je nespecifická, produkci jednoho fytoalexinu je schopno vyvolat více elicitorů)
- lokální anatomická reakce (léčení ran způsobených škůdci tím, že rostlina utěsňuje buněčné stěny produkcí kalosy a lignanu)
- aktivace enzymů (zrychlená syntéza hydroláz štěpících povrch parazita – chitináza, glukonáza)¹⁵

3.3.2. Mechanismus účinku elicitoru

Většina obranných reakcí rostliny je závislá na aktivaci vhodných genů. Elicitory obvykle neovlivňují genovou aktivitu přímo, ale zprostředkovaně pomocí přenašečů signálu (označovaných také jako druzí poslové; second messenger). Ti pak přenášejí signály v buňce transdukčními signálními cestami, což vede ke genové expresi a biochemickým změnám. Přenos extracelulárního signálu do intracelulárního signálního systému a následně k DNA v jádře je možný více systémy.

Byly nalezeny některé komponenty signálního transdukčního řetězce, které pomáhají přenosu signálu přes membránu do buňky. Jedná se o G-protein, vápenaté ionty a proteinkinázy.

Předpokládá se, že molekuly biotického elicitoru interagují se specifickými membránovými receptory. Obsazení receptoru může vést k aktivaci G-proteinu, k otevření vápenatých kanálů a k rychlému influxu vápenatých iontů do buňky. G-protein leží na vnitřní straně plazmatické membrány. Po navázání elicitoru na vazebné místo receptoru se mění konformace receptoru a v tomto stavu váže na své intracelulární části G-protein.

Aktivací G-proteinu je umožněn vstup vápníku do buňky přes vápníkový kanál. Extracelulární vápník je považován za signál, který přináší informaci o poranění dovnitř buňky. Další předpokládaný zdroj vápenatých iontů, který pochází z intracelulárních organel (mitochondrie, endoplasmatické retikulum), přenáší informace v buňce. Ionty Ca^{2+} se uvnitř buňky váží na bílkovinu kalmodulin, která má čtyři vazebná místa pro vápenaté ionty a narůstající komplex kalcium-kalmodulin moduluje mnoho fyziologických procesů. Vzniklý komplex ovlivňuje aktivitu určitých proteinkináz.

Zvýšení koncentrace vápenatých iontů v cytozolu, a tím i aktivace proteinkináz může být dosaženo i jinými cestami. Přenos signálu může být zprostředkován pomocí fosfoinositolového systému, při kterém hydrolýzou lipidů plazmatické membrány jsou generovány dvě signální sloučeniny: inositol-1,4,5-trifosfát a diacylglycerol, které za účasti

iontů vápníku aktivují proteinkinázy a posléze i expresi genů.

Některé pokusy dokazují, že velmi častým a rychlým způsobem přenosu signálu a aktivace genové exprese je také tvorba superoxidu a dalších aktivních forem kyslíku vyvolané elicitory. Zvýšené množství peroxidu je možné zjistit po 5 až 10 minutách působení elicitoru. Kromě možného přímého účinku mohou reaktivní kyslíkové deriváty ovlivňovat expresi genů i nepřímo - způsobují totiž peroxidaci membránových lipidů, což vede k zvýšení syntézy stresových fytohormonů, jejichž signální funkce jsou již známy.¹⁵ Prudké zvýšení hladiny peroxidu vodíku bylo zjištěno např. po aplikaci kademnatých iontů u suspenzní kultury *Nicotiana tabacum*.¹⁶

U abiotických elicitorů ovšem nedochází k vazbě na specifický receptor, ale např. těžké kovy pravděpodobně spouštějí peroxidaci lipidů membrány, a tak dochází ke zvýšené propustnosti membrány pro vápenaté ionty. Ionty těžkých kovů jako Mn^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} jsou esenciální mikroelementy pro rostlinný metabolismus, ale pokud jsou v nadbytku, mohou být vysoce toxické. Proto v rostlině existují mechanismy pro uspokojení požadavků buněčného metabolismu, ale také k ochraně buněk proti toxickému působení. Tyto mechanismy ještě nebyly zcela definovány, ačkoliv počet genů, které kódují možné transportní struktury, již byl určen.¹⁸ Ionty těžkých kovů vyvolají aktivaci transkripce několika genů tvorbou fytochelatinů. Jsou to malé peptidy syntetizované z glutathionu, které inaktivují těžké kovy tvorbou komplexů.¹⁹

Chlorid rtuťnatý způsobuje v buněčné kultuře *Zea mays* změny v transkripci genů podobných těm, které byly pozorovány jako odpověď na infekci patogeny (geny chitinas, 1,3- β -glukonasa a další). Po působení chloridu rtuťnatého se aktivovaly proteiny bohaté na glycin, proteiny tepelného šoku a membránových kanálů. Snahou studie bylo zjistit, zda pozorované změny mohou být považovány za specifickou odpověď na stres těžkými kovy, nebo zda se jedná o všeobecnou odpověď na abiotický stres.

Pro tento účel byl sledován účinek chloridu sodného, tepla, chladu, UV záření a zranění na expresi genů, které jsou indukovány právě chloridem rtuťnatým. Zjistilo se, že

proteiny syntetizované jako odpověď na chlorid rtuťnatý, nejsou specifické pro stres těžkými kovy, ale že se jedná zřejmě o obecnou reakci na abiotické elicitory.²⁰

3.3.3. Elicitory

Elicitory jsou signální látky, jejichž původ je biologický či nebiologický. Mají schopnost dát podnět k aktivaci genů, které jsou nezbytné pro syntézu fytoalexinů. Elicitory aktivují určité enzymy, které katalyzují tvorbu antimikrobiálně působících sekundárních látek (fytoalexinů) i jiných stresových látek s charakterem sekundárních metabolitů.

3.3.3.1. Biotické elicitory

Jde o organické látky se signálním účinkem. Řadíme mezi ně:

- celé intaktní patogenní i nepatogenní organismy nebo jejich části: viry, bakterie (např. *Pseudomonas*), houby (např. *Candida*, *Aspergillus*), kvasinky, mykoplazmata
- organické molekuly parazitických organismů: oligosacharidy, glykoproteiny, mastné kyseliny
- endogenní konstitutivní elicitory: organické molekuly pocházející z buněk napadené rostliny: chitosan, oligogalakturonidy, kyselina jasmínová, kyselina salicylová

3.3.3.2. Abiotické elicitory

Jde o chemické a fyzikální vlivy, které stresují rostlinu a spouštějí tvorbu

fytoalexinů. Výhoda abiotických elicitorů spočívá v tom, že jsou chemicky zcela definované, lze je přesněji dávkovat a jsou zpravidla finančně dostupné. Řadíme mezi ně:

- soli těžkých kovů: CuCl_2 , HgCl_2 , CdCl_2 , CuSO_4 , MnSO_4 , PbNO_3
- inhibitory látkové výměny: kyselina trichloroctová, 2,4-dinitrofenol
- fyzikální vlivy: UV záření, gama záření, změny pH a osmotického tlaku
- detergenty
- rostlinné ochranné prostředky: pesticidy¹⁵

3.3.4. Kadmium

Kadmium patří ke kovům II.b skupiny periodické soustavy. Jeho atomová hmotnost je 112,41; patří mezi neušlechtilé kovy. Kadmium netvoří vlastní minerály, provází v malých množstvích zinek v jeho rudách. Do potravinového řetězce se celoplošně dostává vyluhováním z aplikovaných fosfátových hnojiv původem ze Severní Afriky. Dalšími významnými zdroji jsou emise ze spalovacích procesů, rudných dolů a hutního průmyslu, z důlních a průmyslových odpadních vod, průmyslových kalů, průnikem ze skládek. Užívá se také při výrobě Ni-Cd baterií, lehkotavitelných slitin, barev na sklo (kadmiová žlut').

V ovzduší se nachází asi $0,002 \mu\text{g}/\text{m}^3$ kadmia, ve vodě asi $1 \mu\text{g}/\text{l}$ až $10 \mu\text{g}/\text{l}$. Nekontaminované půdy mívají obsah v sušině $0,006 - 5,0 \text{ mg}/\text{kg}$, kontaminované až o dva řády vyšší. Rostliny mají rozdílnou rezistenci vůči účinkům kadmia – příklad citlivých jsou špenát, sója, odolných rajčata, brambory. Nejvíce akumulují kadmium listové zeleniny jako špenát, salát, dále jsou nalézány vysoké hodnoty v máku. U obilí je obsah koncentrován do slupek, z tohoto důvodu bývají nalézány několikanásobně vyšší

koncentrace u celozrnné mouky.

K příjmu do organismu významně přispívá kouření: jedna cigareta obsahuje 1 – 2 μg Cd a z tohoto množství je po inhalaci přibližně 10 % absorbováno. Kadmium je poměrně špatně absorbováno z gastrointestinálního traktu – asi 5 – 8 % z celkové dávky, ale i přesto je u člověka hlavní příjem alimentární cestou. Akutní toxicita po perorálním příjmu se projevuje nauzeou, zvracením, průjmem, bolestí břicha, po inhalaci se do 24 hodin rozvíjí akutní pneumonie. Při chronické expozici navozuje kadmium nefrotoxicitu, emphysem, plicní fibrózu, osteomalacii, měknutí kostí a tím četné bolestivé zlomeniny (nemoc *ITAI-ITAI* pozorovaná v Japonsku).

Epidemiologicky byl prokázán větší výskyt rakoviny u lidí profesionálně exponovaných tomuto kovu. Kadmium zřejmě indukuje nádory plic a prostaty u člověka. Riziko karcinogenních účinků sloučenin Cd se zvyšuje při současném příjmu dusičnanů a dusitanů a při tabakismu. Preventivně toxicitu Cd snižuje zvýšený přívod Ca, Zn, Se, Fe a vysoké dávky vitamínu C.^{21,22,23}

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Použitý materiál, přístroje a pomůcky

4.1.1. Rostlinný materiál

K pokusům uvedeným v této práci byly použity suspenzní kultury, odvozené ze sterilní klíčící rostliny jetele lučního, *Trifolium pratense* L., *Fabaceae* (varieta DO-9 a SPRINT). Semena byla získána ze šlechtitelské stanice Domoradice. Elicitace byla provedena u tříletých suspenzních kultur.

4.1.2. Stanovení ztráty sušením

Ztráta sušením je ztráta hmotnosti vyjádřená v hmotnostních procentech. Do váženky, předem vysušené 2 hodiny při 105 °C, byly odváženy asi 2,000 g explantátové kultury. Váženka s obsahem byla zvážena a sušena 2 hodiny v sušárně při 105 °C. Po vysušení a vychladnutí v exsikátoru byla zvážena. Ztráta sušením byla vztažena na navážku explantátové kultury a vyjádřena v procentech. Výsledná hodnota ztráty sušením (DO 9 – 5,58 %, SPRINT – 5,41 %) je aritmetický průměr ze tří stanovení.²⁴

4.1.3. Chemikálie

- 6-benzylaminopurin č., Lachema Brno
- Dihydrogenfosforečnan sodný č., Lachema Brno
- Dusičnan draselný p.a., Lachema Brno
- Ethanol 96%, Lachema Brno
- Chloramin B, Lachema Brno

- Chlorid kobaltnatý p.a., Lachema Brno
- Chlorid pyridoxinia č., Koch-Light Laboratories, Colnbrook
- Chlorid thiaminia č., Koch-Light Laboratories, Colnbrook
- Chlorid vápenatý p.a., Lachema Brno
- Jodid draselný p.a., Lachema Brno
- Kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová č., Lachema Brno
- Kyselina boritá p.a., Lachema Brno
- Kyselina chlorovodíková p.a., Lachema Brno
- Kyselina mravenčí bezvodá p.a., Lachema Brno
- Kyselina nikotinová č., Lachema Brno
- Kyselina octová bezvodá p.a., Lachema Brno
- Kyselina octová ledová p.a., Lachema Brno
- Kyselina šťavelová č., Lachema Brno
- Methanol p.a., Lachema Brno
- Molybdenan sodný p.a., Lachema Brno
- Myoinositol č., Sigma St. Louis
- Sacharóza p.a., Lachema Brno
- Síran amonný p.a., Lachema Brno
- Síran hořečnatý p.a., Lachema Brno
- Síran manganatý p.a., Lachema Brno
- Síran měďnatý p.a., Lachema Brno
- Síran zinečnatý p.a., Lachema Brno
- Síran železnatý p.a., Lachema Brno

4.1.4. Přístroje a pomůcky

- Analytické váhy A 200S, Santorius, Göttingen
- Autokláv PS 20A, Chirana, Brno
- Horkovzdušný sterilizátor HS 31A, Chirana, Brno
- Box s laminárním prouděním Fatran LF, Žilina

- Roler, Vývojové dílny AV ČR, Praha
- Třepačka Unimax 2010, Heidolph
- Spektrofotometr CE 1010, Cecil Instruments, Cambridge
- Chromatografická sestava Jasco (čerpadlo PU-2089, detektor MD-2015, autosampler AS-2055), Merck, Darmstadt
- Kolona LiChrosper RP-18 250x4 (5 μ m) s předkolonkou, Merck, Darmstadt

4.2. Kultivace explantátové kultury

4.2.1. Kultivační nádoby a nástroje

Ke kultivaci explantátových kultur bylo použito nádobí z varného skla značky SIAL, které je dostatečně odolné vůči vodě, chemikáliím a rozdílům teplot. Suspenzní kultury byly kultivovány ve 250ml varných baňkách z téhož skla.

Kovové nástroje byly opláchnuty 96% ethanolem a po zabalení do hliníkové fólie

sterilizovány 2 hodiny v horkovzdušném sterilizátoru při teplotě 200 °C. Pipety s kouskem vaty vloženým do jejich horního konce byly také sterilizovány v hliníkové fólii 15 minut při teplotě 121°C v autoklávu.

4.2.2. Příprava živného média

Pro kultivaci tkáňových kultur bylo použito živné médium dle Gamborga, které má následující složení:²⁵

KNO ₃	2500,00	mg/l
CaCl ₂ . 2 H ₂ O	150,00	mg/l
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	250,00	mg/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	134,00	mg/l
NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O	150,00	mg/l
FeSO ₄ . 7 H ₂ O	27,84	mg/l
Na ₂ EDTA	37,34	mg/l
KI	0,75	mg/l
H ₃ BO ₃	3,00	mg/l
MnSO ₄ . H ₂ O	10,00	mg/l
ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	2,00	mg/l
Na ₂ MoO ₄ . 2 H ₂ O	0,25	mg/l
CuSO ₄ . 5 H ₂ O	0,025	mg/l
CoCl ₂ . 6 H ₂ O	0,025	mg/l
myoinositol	100,00	mg/l
kyselina nikotinová	1,00	mg/l
pyridoxin	1,00	mg/l
thiamin	10,00	mg/l
sacharosa	30 000,00	mg/l

Jako stimulátor růstu byla použita 2 mg/l 2,4-dichlorfenoxyoctová kyselina v kombinaci s 2 mg/l 6-benzylaminopurinem.

Půda připravená pro kultivaci suspenzní kultury byla rozlita po 25 ml do varných baněk. Baňky byly uzavřeny hliníkovou fólií a sterilizovány v autoklávu 15 minut při teplotě 121 °C a tlaku páry 0,1 MPa.

4.2.3. Pasážování a kultivace

Pasážování bylo prováděno v aseptickém boxu s laminárním prouděním, jehož prostor byl vymyt roztokem Ajatinu (1:10) a vyzářen nejméně 1 hodinu germicidní zářivkou. Při práci byly vždy zachovány přísně aseptické podmínky, bylo použito sterilní sklo a nástroje.

Suspenzní kultura byla odvozena z rozpadavé kalusové kultury mechanickým rozvolněním na třepačce a následně kultivována na pomaloběžném roleru. Pasážování bylo prováděno vždy po 14 dnech subkultivace přenesením části narostlé suspenze do baněk s čerstvým médiem dle Gamborga. Kultivace probíhala při teplotě 25 °C a světelné periodě 16 hodin světlo a 8 hodin tma.

4.3. Elicitace

K elicítaci byly použity roztoky chloridu kademnatého o koncentraci 0,1 µmol, 1 µmol, 10 µmol, 100 µmol.

Elicitace suspenzní kultury byla prováděna za aseptických podmínek v boxu s laminárním prouděním vzduchu. Při elicítaci byl přidáván 1,0 ml elicítoru příslušné koncentrace k suspenzní kultuře ve 21. dni kultivace. Ke kontrolním kulturám byl přidáván 1,0 ml destilované vody.

K experimentu bylo vzato 108 kultivačních baněk. Soubor 12 baněk bez elicitoru sloužil jako kultura kontrolní. Do ostatních 96 baněk s kulturou byl přidán vždy 1,0 ml elicitoru o příslušné koncentraci. Potom byly baňky pečlivě uzavřeny hliníkovou fólií a dále kultivovány za již uvedených podmínek. Vznikly tak 4 soubory šesti baněk s elicitovanou kulturou.

Elicitované kultury byly odebírány po 6, 24, 48 a 168 hodinách. Odběry kontrolních kultur byly provedeny po 6 a 168 hodinách. Buňky byly odděleny od kultivačního média filtrací za sníženého tlaku a byly sušeny při laboratorní teplotě.

4.4. Stanovení obsahu flavonoidů

Obsah flavonoidů byl stanoven spektrofotometricky po reakci s roztokem kyseliny borité a kyseliny šťavelové v kyselině mravenčí bezvodé.²⁴

Základní roztok: 0,400 g práškové drogy se ve 250ml baňce smíchá se 40 ml lihu R 60% (V/V) a zahřívá se 10 minut ve vodní lázni při 60 °C, za častého protřepávání. Po ochlazení se zfiltruje přes chomáček vaty do 100ml odměrné baňky. Chomáček vaty se vloží ke zbytku drogy ve 250ml baňce, přidá se 40 ml lihu R 60% (V/V) a zahřívá se 10 minut ve vodní lázni při 60 °C, za častého protřepávání. Po ochlazení se zfiltruje do téže odměrné baňky. 250ml baňka i filtr se promyjí lihem R 60% (V/V) a promývací tekutina se přidá do odměrné baňky. Spojené roztoky se zředí lihem R 60% (V/V) na 100,00 ml a roztok se zfiltruje.

Zkoušený roztok: 5,0 ml základního roztoku se odpaří v baňce s kulatým dnem za sníženého tlaku do sucha. Zbytek se rozpustí v 8 ml směsi objemových dílů methanolu R a kyseliny octové ledové R (10 + 100) a převede se do 25ml odměrné baňky. Baňka s kulatým dnem se promyje 3 ml směsi objemových dílů methanolu R a kyseliny octové ledové R (10 + 100) a promývací tekutina se převede do téže odměrné baňky. K tomuto roztoku se přidá 10,00 ml roztoku, který obsahuje kyselinu boritou R (25,0 g/l) a kyselinu

šřavelovou R 20,0 g/l) v kyselině mravenčí bezvodé R a zředí se kyselinou octovou bezvodou R na 25,0 ml.

Kontrolní roztok: 5,0 ml základního roztoku se odpaří v baňce s kulatým dnem za sníženého tlaku do sucha. Zbytek se rozpustí v 8 ml směsi objemových dílů methanolu R a kyseliny octové ledové R (10 + 100) a převede se do 25ml odměrné baňky. Baňka s kulatým dnem se promyje 3 ml směsi objemových dílů methanolu R a kyseliny octové ledové R (10 + 100) a promývací tekutina se převede do téže odměrné baňky. K tomuto roztoku se přidá 10,0 ml kyseliny mravenčí bezvodé R a zředí se kyselinou octovou bezvodou R na 25,0 ml.

Po 30 minutách se měří absorbance (2.2.25) zkoušeného roztoku při 410 nm proti kontrolnímu roztoku.

Obsah flavonoidů v procentech, vyjádřeno jako hyperosid ($C_{21}H_{20}O_{12}$) se vypočítá podle vzorce:

$$A \cdot 1,235 / m$$

v němž značí:

A – absorbanci roztoku v maximu při 410 nm

m – hmotnost zkoušené drogy v gramech

Specifická absorbance má hodnotu 405

4.5. Stanovení obsahu isoflavonoidů

Ke stanovení genisteinu, daidzeinu, genistinu a formononetinu byla zvolena metoda HPLC.²⁴

4.5.1. Příprava vzorku

Asi 0,8000 g upráškované kultury se ve 100ml baňce smíchá s 15 ml methanolu

80% a extrahuje se 30 minut na vodní lázni pod zpětným chladičem. Po ochlazení se zfiltruje přes malý chomáček vaty do 25ml odměrné baňky. Chomáček vaty se vloží ke zbytku kultury ve 100ml baňce, přidá se 15 ml methanolu 80% a extrahuje se ještě jednou 20 minut na vodní lázni pod zpětným chladičem. Po ochlazení se zfiltruje do téže odměrné baňky a spojené extrakty se zředí methanolem 80% na 25,0 ml. Roztok se převede přes mikrofiltr do vialek a analyzuje se metodou HPLC.

4.5.2. HPLC analýza

HPLC analýzy byly prováděny na chromatografické sestavě Jasco (čerpadlo PU-2089, detektor MD-2015, autosampler AS-2055), vybavené předkolonkovým filtrem a kolonou LiChrospher RP-18 250x4 (5 μ m) s ochranou předkolonkou.

Eluce mobilní fáze probíhala nejdříve gradientově. V čase $t = 0$ bylo složení 30% methanolu a 70% vody, v čase $t = 9$ min 80% methanolu a 20% vody. Následovala isokratická eluce stejným složením do času $t = 15$ min.

Průtok byl 1,1 ml/min, mobilní fáze obsahovala jako pufr 0,15% kyseliny fosforečné.

Detekce byla provedena pomocí DAD detektoru v rozmezí vlnových délek 200 – 650 nm. Obsah sledovaných látek byl vypočten z píků při vlnové délce 260 nm. Obsah všech látek byl kvantifikován matematickou metodou normalizace a porovnáním s kalibrační křivkou vytvořenou pomocí externě měřeného standardu téže látky.

4.6. Statistické vyhodnocení

Statistické zpracování naměřených hodnot obsahu flavonoidů v kulturách *Trifolium pratense* L. bylo provedeno na základě T-testu (test významnosti rozdílu dvou průměrů), pro zvolenou hladinu významnosti $p = 0,05$.

Aritmetický průměr

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

Směrodatná odchylka

$$s = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

n..... rozsah souboru

x_1 naměřené hodnoty

\bar{x} aritmetický průměr

s..... směrodatná odchylka

T – test

$$t = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{n_1 s_1^2 + n_2 s_2^2}} \sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 - 2)}{n_1 + n_2}}$$

n_1 počet členů pokusného souboru

n_2 počet členů kontrolního souboru

\bar{x}_1 aritmetický průměr pokusného souboru

- x₂..... aritmetický průměr kontrolního souboru
- s₁..... směrodatná odchylka pokusného souboru
- s₂..... směrodatná odchylka kontrolního souboru
- t..... testovací kritérium

Testovacímu kritériu přísluší t rozdělení se stupněm volnosti (v) vypočítané podle vztahu :

$$v = n_1 + n_2 - 2$$

Kritická hodnota **t(v)_p** pro p(0,05) a v(2) = 2,92

Hodnotu testovacího kritéria (**t**) srovnáme s příslušnou kritickou hodnotou **t(v)_p** pro vypočítaný stupeň volnosti (**v**) a zvolenou hladinu významnosti (**p**). Je-li hodnota (**t**) větší než hodnota **t(v)_p**, je rozdíl $|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|$ statisticky významný na hladině významnosti.²⁸

5. VÝSLEDKY

5.1. *Tabulky*

Tabulka 1. Produkce flavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L.(varieta DO-9) elicitované chloridem kademnatým

Koncentrace	Doba	Elicitace	Kontrola	T-test
-------------	------	-----------	----------	--------

elicitoru (μmol)	aplikace elicitoru (hod)	Průměrný obsah (%)	Směrodatná odchylka	Průměrný obsah (%)	Směrodatná odchylka	
0,1	6	0,295	0,004	0,174	0,002	28,441
	24	0,132	0,004	0,174	0,002	11,030
	48	0,125	0,002	0,174	0,002	19,400
	168	0,504	0,029	0,249	0,007	8,672
1	6	0,339	0,003	0,174	0,002	56,938
	24	0,157	0,007	0,174	0,002	2,548
	48	0,137	0,005	0,174	0,002	7,800
	168	0,498	0,025	0,249	0,007	9,591
10	6	0,158	0,009	0,174	0,002	1,854
	24	0,101	0,003	0,174	0,002	23,324
	48	0,134	0,007	0,174	0,002	5,996
	168	0,230	0,014	0,249	0,007	1,214
100	6	0,218	0,004	0,174	0,002	72,388
	24	0,183	0,001	0,174	0,002	5,270
	48	0,188	0,002	0,174	0,002	6,600
	168	0,294	0,050	0,249	0,007	0,891

Tabulka 2. Produkce flavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. (varieta SPRINT) elicitované chloridem kademnatým

Koncentrace elicitoru (μmol)	Doba aplikace elicitoru (hod)	Elicitace		Kontrola		T-test
		Průměrný obsah (%)	Směrodatná odchylka	Průměrný obsah (%)	Směrodatná odchylka	
0,1	6	0,472	0,013	0,156	0,005	25,060
	24	0,283	0,005	0,156	0,005	26,669

	48	0,156	0,021	0,156	0,005	0,024
	168	0,224	0,008	0,190	0,005	3,198
1	6	0,265	0,010	0,156	0,005	11,281
	24	0,168	0,020	0,156	0,005	0,588
	48	0,055	0,003	0,156	0,005	34,814
	168	0,192	0,002	0,190	0,005	0,908
10	6	0,361	0,001	0,156	0,005	129,337
	24	0,336	0,011	0,156	0,005	16,923
	48	0,122	0,017	0,156	0,005	2,082
	168	0,235	0,010	0,190	0,005	3,687
100	6	0,376	0,008	0,156	0,005	27,029
	24	0,198	0,009	0,156	0,005	4,808
	48	0,163	0,014	0,156	0,005	0,497
	168	0,260	0,003	0,190	0,005	9,191

Zvýrazněné hodnoty obsahu flavonoidů jsou statisticky významně vyšší než hodnoty kontroly, $p = 0,05$.

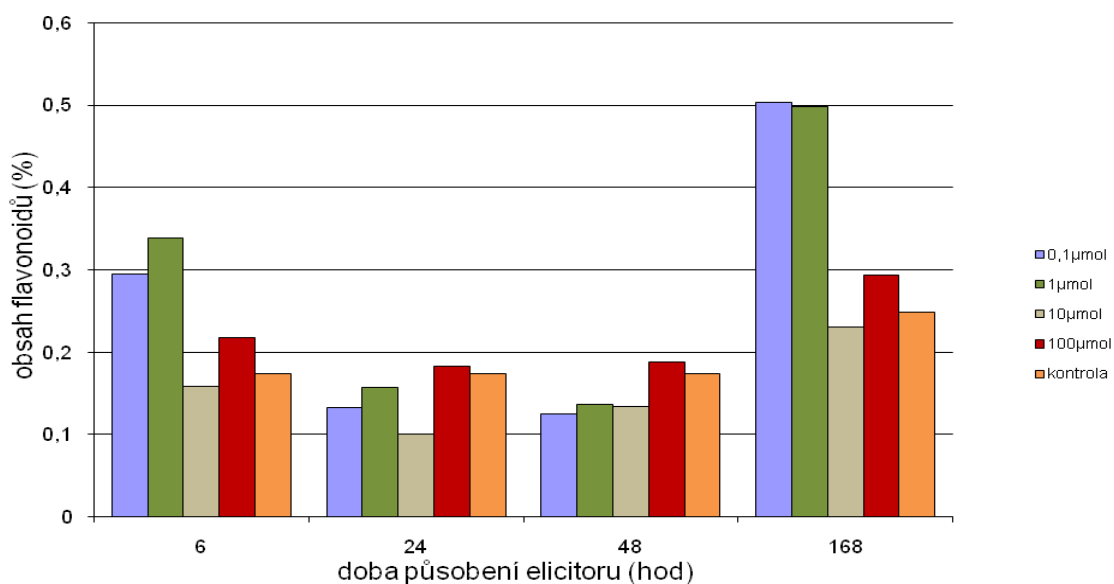
Tabulka 3. Produkce isoflavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. (varieta SPRINT) elicitované chloridem kademnatým

Koncentrace elicitoru (μmol)	Doba aplikace elicitoru (hod)	Obsah isoflavonoidů (%)			
		genistein	daidzein	genistin	formononetin
0,1	6	0,01	0,02	-	-
	24	0,01	0,02	-	-
	48	0,02	0,02	-	-
	168	0,02	0,03	-	-

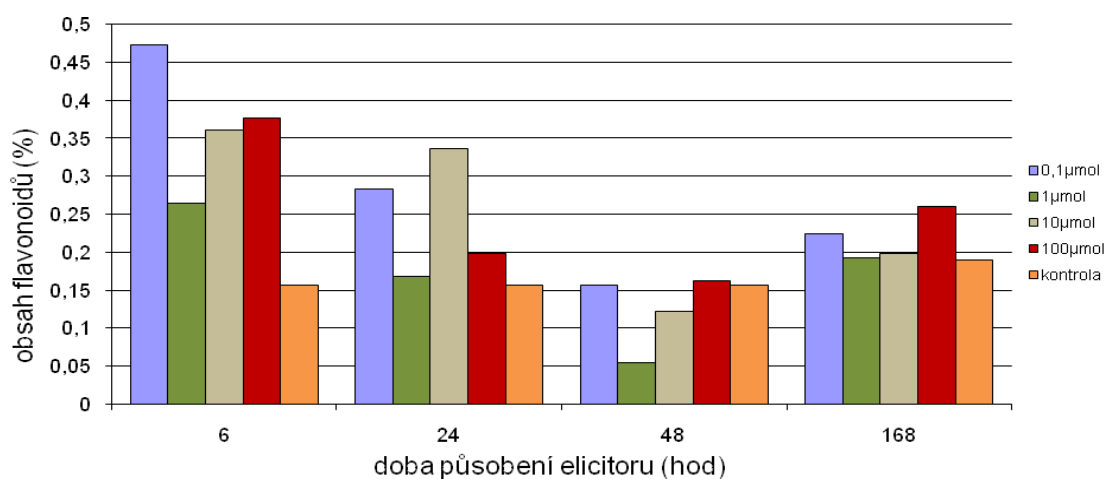
1	6	0,01	0,02	-	-
	24	0,01	0,02	-	0,01
	48	0,01	0,02	-	-
	168	0,01	0,02	-	0,01
10	6	0,01	0,03	-	-
	24	0,02	0,04	-	0,01
	48	0,01	0,03	-	-
	168	0,01	0,02	-	-
100	6	0,01	0,03	-	-
	24	0,01	0,03	-	-
	48	0,01	0,03	-	-
	168	0,02	0,01	-	-
kontrola	6	0,01	0,02	-	-
	24	0,01	0,02	-	-
	48	0,01	0,02	-	-
	168	0,01	0,01	-	-

5.2. Grafy

Graf 1. Suspenzní kultura *Trifolium pratense* L. (varieta DO-9) elicitovaná chloridem kademnatým



Graf 2. Suspenzní kultura *Trifolium pratense* L. (varieta SPRINT) elicitovaná chloridem kademnatým



6. DISKUSE

Využití explantátových kultur jako zdroje důležitých rostlinných metabolitů pro farmacii, potravinářství, kosmetiku a zemědělství se jeví jako velmi perspektivní. Ekonomické parametry takto získaných produktů jsou však obvykle nižší než u látek získaných z intaktních rostlin. Jsou proto hledány techniky, kterými by bylo možné produkci sekundárních metabolitů v těchto kulturách zvýšit. Jednou z možností intenzifikace se jeví metoda elicitace.¹⁵

Mezi elicitory lze zařadit také soli těžkých kovů. Jsou známy některé mechanismy, kterými těžké kovy ovlivňují (v kladném i záporném smyslu) intenzitu biosyntetických dějů.¹⁵ Při optimalizaci podmínek lze tedy elicitacních účinků iontů těžkých kovů využít k cílené produkci sekundárních metabolitů.

K nejpoužívanějším abiotickým elicitorům ze skupiny těžkých kovů patří olovnaté a kadmennaté ionty. Je prokázáno, že mohou navodit zvýšení syntézy specifických sekundárních metabolitů, jejich nevýhodou je však výrazné toxické působení na rostlinné buňky, které se projevuje úbytkem biomasy a následně i útlumem produkce.

V současnosti je zřejmý stoupající zájem o produkci flavonoidů a isoflavonoidů rostlinnými explantáty, což souvisí s širokým spektrem biologických účinků těchto látek. Velmi nadějným zdrojem těchto přírodních látek je jetel luční (*Trifolium pratense* L., *Fabaceae*). Je užíván v lidovém léčitelství a jako hospodářská plodina. V současnosti je k dispozici celá řada přípravků s obsahem jetele lučního, které jsou doporučovány ženám ke zmírnění či odstranění příznaků menopauzy. Mnohé studie se proto snaží potvrdit toto příznivé působení, jejich výsledky však nejsou ale jednotné.³⁰

U suspenzní kultury *Trifolium pratense* L. (variety DO-9, SPRINT) byl sledován vliv elicitoru chloridu kadmennatého na produkci flavonoidů a isoflavonoidů.

K abiotické elicitaci byly použity čtyři vodné roztoky chloridu kademnatého o koncentracích 100 μM , 10 μM , 1 μM a 0,1 μM , které byly zvoleny na základě literární rešerše.³²⁻³⁶

Také sledované doby působení tohoto elicitoru (6, 24, 48 a 168 hod.) vycházely z publikovaných údajů, které udávají zvýšení produkce sekundárních metabolitů v průběhu několika hodin až dní po aplikaci iontů těžkých kovů.³²⁻³⁴ Kontrolní kultury byly odebírány pouze po 6 a 168 hodinách, neboť se jejich produkce v takto krátkých časových intervalech výrazně nemění.

Dalším faktorem, který může ovlivnit úspěšnost elicitace, je fyziologický stav kultury, respektive její růstová fáze. Z předcházejících pokusů vyplývá, že pro elitaci suspenzní kultury *Trifolium pratense* L. je optimální 21. den subkultivace, a proto elitace kultury byla provedena v tomto dni kultivace.¹²

Sledujeme-li vliv abiotické elitace na produkci flavonoidů suspenzní kulturou *Trifolium pratense* L. varieta DO-9 (tab. č. 1, graf č. 1) v závislosti na délce působení a koncentraci chloridu kademnatého je zřejmé, že u nejkratší 6hodinové aplikace se pozitivní elicitální účinek projevil u všech sledovaných koncentrací elicitoru (s výjimkou koncentrace 10 μM), přičemž vyšší produkci způsobily nejslabší koncentrace elicitoru 1 μM a 0,1 μM . Následující 24 ani 48hodinové působení elicitoru v žádném případě produkci pozitivně neovlivnilo. K maximálnímu zvýšení akumulace sledovaných metabolitů došlo až po 168hodinové elitaci všemi koncentracemi chloridu kademnatého. Přičemž nejvyšší obsah flavonoidů (0,504 %) byl zjištěn po 168hodinovém působení 0,1 μM roztoku chloridu kademnatého.

U suspenzní kultury *Trifolium pratense* L. varieta SPRINT (tab.2, graf č.2) byla produkce stimulována nejlépe již po nejkratší 6hodinové aplikaci elicitoru, kdy všechny koncentrace chloridu kademnatého statisticky významně zvýšily obsah flavonoidů oproti kontrole. Maximální obsah (0,472 %) byl zjištěn po 6hodinovém působení 0,1 μM roztoku chloridu kademnatého, tedy opět jako u předcházející variety nejslabší koncentrace sledovaného elicitoru. 24hodinovou aplikaci elicitoru nelze

jednoznačně hodnotit a 48hodinové působení sledovaných koncentrací elicitoru produkci pozitivně neovlivnilo. Avšak nejdelší 168hodinová aplikace všech koncentrací roztoku chloridu kademnatého opět zvýšení obsahu flavonoidů v porovnání s kontrolou způsobila.

Na základě uvedených výsledků lze konstatovat, že abiotická elicítace explantátové kultury *Trifolium pratense* L. chloridem kademnatým stimulovala v porovnání s kontrolní kulturou produkci flavonoidů v suspenzní kultuře variety DO-9 o 102 % a u variety SPRINT o 202 %. Zvýšení akumulace sledovaných metabolitů nebylo příliš velké, což může být způsobeno již poměrně vysokou produkcí kontrolní kultury. Proces elicítace má totiž pozitivní vliv především na ty kultury, u nichž jsou výchozí hladiny sekundárních látek nízké.

V suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L., varieta SPRINT elicítované chloridem kademnatým byla sledována metodou HPLC také produkce isoflavonoidů. V kontrolní kultuře byly zjištěny isoflavonoidy genistein a daidzein (tab. č. 3). Kladně lze hodnotit zejména 24hodinovou aplikaci koncentrace 10 μ M, která zvýšila obsah genisteinu a daidzeinu o 100% a vyvolala produkci formononetinu, který u kontrolní kultury zaznamenán nebyl. Koncentrace isoflavonoidů ve sledované kultuře jsou ovšem velmi nízké.

Využití chloridu kademnatého jako elicitoru lze na základě literárních zdrojů dokumentovat na řadě příkladů.^{32,33,34} Také výsledky našich pokusů naznačují, že sledovaný elicitor ovlivnil produkci především flavonoidů explantátovou kulturou *Trifolium pratense* L. pozitivně, a proto by tato kultura mohla být dobrým experimentálním systémem pro další studie těchto významných přírodních látek.

7. ZÁVĚR

Výsledky této práce lze shrnout do následujících bodů:

- 1) Nejvyšší obsah flavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. varieta DO-9 vyvolala 168hodinová elicitace 0,1μM roztokem chloridu kademnatého, kdy došlo ke statisticky významnému zvýšení produkce o cca 102% oproti kontrolní kultuře.
- 2) Maximální obsah flavonoidů v suspenzní kultuře *Trifolium pratense* L. varieta SPRINT vyvolala 6hodinová elicitace 0,1μM roztokem chloridu kademnatého, kdy došlo ke statisticky významnému zvýšení produkce o cca 202% v porovnání s kontrolní kulturou.
- 3) Pomocí metody HPLC bylo zjištěno, že explantátová kultura *Trifolium pratense* L. obsahuje isoflavonoidy genistein, daidzein a formononetin. Elicitace chloridem kademnatým ovlivnila tuto produkci pozitivně.
- 4) Bylo potvrzeno, že chlorid kademnatý patří k významným signálním látkám rostlinných obranných reakcí, které vedou ke zvýšené produkci sekundárních metabolitů.

8. SEZNAM LITERATURY

1. Pilát, A., Ušák, O.: Atlas rostlin, SPN, Praha 1964; s. 37
2. Slavík, B. et al.: Květena České republiky, Academia, Praha 1995; s. 474
3. Hron, F., Zejbrlík, O.: Rostliny polí a zahrad, SPN, Praha 1974; s. 192
4. Korbelář, J., Endris Z., Naše rostliny v lékařství, Avicenum, Praha 1981; s. 178
5. Gran, J., Jung, R., Munker, B.: Bobulovité užitkové a léčivé rostliny, Ikar, Praha 1996; s. 102
6. <http://encyklopedie.seznam.cz/heslo/444119-jetel-lucni>, 25. 11. 2007
7. <http://www.prvnikrok.cz/detail-clanek.php?clanek=1001>, 25. 11. 2007
8. <http://faf.vfu.cz/html/txts/isoflav/vseobvlast.html>, 25. 11. 2007
9. <http://faf.vfu.cz/html/txts/flavonoids.html>, 25. 11. 2007
10. http://www.flavin7.sk/dl/Dokumentumok/flavin7_antocianidiniiek_sk.pdf, 25. 11. 2007
11. Dušek, J. et al.: Čes. slov. Farm., 1996; 45, s. 204
12. Kašparová, M., Dušek, J.: Čes. slov. Farm., 1999; 48, s. 132
13. Sikyta, B., Dušek, J.: Biotechnologie pro farmaceuty, Karolinum, Praha 1992; s. 9, 10, 38
14. Kováč, J.: Explantátové kultury rostlin, Vydavatelství Univerzity Palackého, Olomouc 1995; s. 13-21, 50-54, 79-82
15. Procházka, S. et al.: Fyziologie rostlin, Academia, Praha 1998; s. 412, 424-425
16. Olmos, E. et al.: Exp. Bot. 2003; 54, s. 291
17. Beiderbeck, R., Reichling, J.: Biologie 3, 1989; s. 188
18. Williams, L. E., Pittman, J. K., Hall, J. L.: Int. J. Biochem. Biophysics, 2000; 1465, s. 104

19. Knerr, R., Zenk, M. H.: *Phytochemistry*, 1997; 44, s. 69
20. Didierjean, L. et al.: *Planta*, 1996; 199, s. 1
21. Kraják. V., Úvod do monitorování životního prostředí, přednášky
22. Vopršalová, M., Žáčková, P.: *Základy toxikologie pro farmaceuty*, Karolinum, Praha 2000; s. 81-84
23. Krätšmár-Šmogrovič, J. et al.: *Všeobecná a anorganická chémia*, Vydavateľstvo Osveta, Martin 1994; s. 384-385
24. De Rijke, E. et al.: *Anal. Chem. Acta*, 2002; 468, 3
25. Gamburg, O. L., Miller, R. A., Ojima, K.: *Exp. Cell Res.*; 1968; 50, s. 151
26. <http://www.dkanet.cz/fytokonsult/Ency-dem-www/page0002.html>
27. Hubík, J. et al.: *Obecná farmakognosie II., Sekundární látky*, SPN, Praha 1989, s. 31-34
28. Klemra, P., Klemrová, V.: *Základy aplikované statistiky pro studující farmacii*, Karolinum, Praha 1993; s. 30, 80
29. Beiderbeck, R., Reichling, J.: *Biologie* 5, 1989; s. 453
30. Baber, R. J. et al.: *Climacteric* 2, 1999; s. 85
31. Talanova, V. V., Titov, A. F., Boeva, N. P.: *Russ. J. Plant Physiol.* 1999; 46, s. 141
32. Tůmová, L., Tůma, J., Staňková, J.: *Herba Pol.*, 1999; 44, s. 28
33. Tůmová, L., Blažková, R.: *Čes. slov. Farm.*, 2002; 51, s. 44
34. Gangon, R., Ibrahim, R. K.: *Phytochemistry*, 1997; 44, s. 1463
35. Kartosentono, S. et al.: *Biotechnol. Lett.*, 2002; 24, s. 687
36. Chakravarty, B., Srivasta, S. et al.: *Ann. Bot.*, 1997; 79, s. 487

Adéla Keřková

Vliv elicitace na produkci suspenzní kultury *Trifolium pratense* L.

Souhrn

V práci byl sledován vliv čtyř koncentrací chloridu kademnatého na produkci flavonoidů a isoflavonoidů suspenzní kulturou *Trifolium pratense* L. (varieta DO-9 a SPRINT).

Kultury byly kultivovány při teplotě 25 °C a světelné periodě 16 hodin světlo/ 8 hodin tma na živném médiu podle Gamborga s přídavkem 2 mg.l⁻¹ 2,4-dichlorfenoxyoctové kyseliny a 2 mg.l⁻¹ 6-benzylaminopurinu. U elicitovaných i kontrolních vzorků bylo provedeno fotometrické stanovení flavonoidů dle Českého lékopisu 2005 a stanovení isoflavonoidů metodou HPLC. Z výsledků vyplývá, že optimální vliv chloridu kademnatého na produkci flavonoidů a isoflavonoidů se projevil u variety DO-9 po 168hodinové aplikaci a u variety SPRINT po 6hodinové aplikaci koncentrace 0,1 μmol.

Adéla Keřková

The Influence of Elicitation on the Production of Suspension Culture of *Trifolium pratense* L.

Summary

The paper examined the effect of four concentrations of cadmium chloride on the production of flavonoids and isoflavonoids by the *Trifolium pratense* L. suspension culture (variety DO-9 and SPRINT).

The cultures were cultivated in the Gamborg nutrient media with the addition of 2

mg.l⁻¹ of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 2 mg.l⁻¹ of 6-benzylaminopurine, at the temperature of 25 °C, 16-hr light/ 8-hr dark period. The elicited and the inspection samples underwent the photometric determination of flavonoids in accordance with the Czech Pharmacopoeia 2005 and the determination of flavonoids via the HPLC method. The results show that the optimal effect of cadmium chloride on the production of flavonoids and isoflavonoids was manifested after a 168-hour application of a concentration 0,1µmol (variety DO-9) and after 6-hour application (variety SPRINT).